



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0097017
(43) 공개일자 2016년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/54 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/54 (2013.01)
A23L 1/3002 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0018802
(22) 출원일자 2015년02월06일
심사청구일자 2015년02월06일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청원군 강외면 오송생명2로 187
(72) 발명자
이성준
서울특별시 강남구 도산대로96길 39, 104동 402호 (청담동, 청담공원아파트)
고광표
서울특별시 서초구 효령로 391, 6동 508호 (서초동, 무지개아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이치영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 12 항

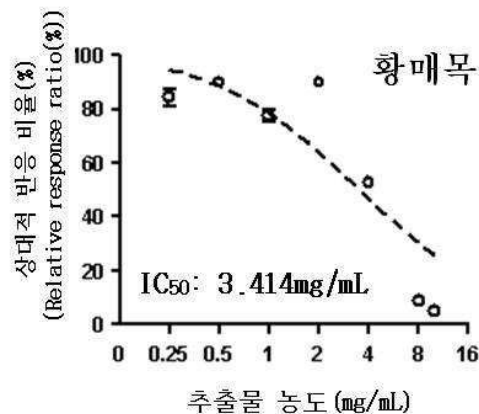
(54) 발명의 명칭 황매목 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물

(57) 요약

본 발명은 황매목 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 노로바이러스(Norovirus) 활성 및 증식을 억제하는 황매목 추출물을 함유하는 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 황매목 추출물은 세포 독성이 낮으면서도, 저농도로 투여했을 경우에도 항바이러스 효과가 탁월하므로, 이를 포함하는 조성물은 노로바이러스 질환의 예방 및 치료에 효과적이고 안전하여 식품 또는 약학 조성물 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

유현주

인천광역시 남동구 석산로169번길 25 (간석동)

김보미

서울특별시 서대문구 독립문로14길 33, 205동 303호 (냉천동, 돈의문센트레빌)

송문정

서울특별시 성북구 종암로25길 30, 101동 1402호 (종암동, 삼성래미안아파트)

이희정

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 연구심사동 A 미생물과 (식품의약품안전처)

주인선

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 연구심사동 A 미생물과 (식품의약품안전처)

이정수

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 연구심사동 A 미생물과 (식품의약품안전처)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 14162MFDS973

부처명 식품의약품안전처

연구관리전문기관 식품의약품안전평가원

연구사업명 노로바이러스 식중독 근원적 예방 연구

연구과제명 노로바이러스 저감화 기술개발 및 제어 물질탐색 연구

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교

연구기간 2014.03.01 ~ 2014.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

황매목 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바이러스는 노로바이러스인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 바이러스는 묽린 노로바이러스 또는 휴먼 노로바이러스인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 황매목 추출물은 작즙 추출, 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 용매 추출, 또는 환류냉각 추출로 수득하는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 용매 추출은 에탄올, 메탄올, 아세톤, 헥산(hexane), 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 물 또는 이들의 혼합물로 추출한 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 6

황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방 및/또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 7

황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방 및/또는 개선용 건강 기능성 식품.

청구항 8

황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방 및/또는 개선용 식품 첨가제.

청구항 9

황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방 및/또는 개선용 식품 소스 또는 샐러드 드레싱.

청구항 10

황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방 및/또는 개선용 사료 첨가제.

청구항 11

황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스에 의한 식중독 예방용 조성물.

청구항 12

황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방용 소독제 또는 세척제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 황매목 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 노로바이러스(Norovirus) 활성 및 증식을 억제하는 황매목 추출물을 함유하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 노로바이러스는 *Caliciviridae*과에 속하는 병원성 바이러스로, 약 7.5~7.6kb 크기의 단일가닥 mRNA 유전체를 가지며 3개의 Open reading frame(ORF)로 구성되어 있다. ORF1은 바이러스 복제를 위해 필수인 단백질로 번역되고 ORF2는 주요 구조적 캡시드 단백질인 바이러스 단백질 1(VP1, viral protein 1)으로 번역된다. VP1은 N-말단 도메인, 외피(S, shell) 도메인, 돌출(protruding) 도메인 1(P1)과 돌출 도메인 2(P2)로 구성되어 있다. S 도메인의 시퀀스는 계속 보존되지만, P1과 P2 도메인의 시퀀스는 계속 변화해 항체 다양성을 보인다. ORF3는 보조 구조적 캡시드 단백질인 바이러스 단백질 2(VP2)로 번역된다.

[0003] 노로바이러스는 유전학, 면역학적으로 매우 다양한 바이러스로 알려졌으며, 유전자형(Genogroup)에 따라 5개의 유전그룹(GI ~GV)으로 분류된다. 이 중 GI와 GII는 사람에게 병을 유발하는 휴먼 노로바이러스(Human Norovirus)이다.

[0004] 노로바이러스는 다양한 유전형 때문에 감염에 대한 백신이나 약이 개발되기 어렵고, 그간 휴먼 노로바이러스는 세포 배양할 수 없는 것으로 알려져 관련 연구가 원활히 진행되지 못해 개발이 더딘 상황이었다. 그러나 최근에 휴먼 노로바이러스의 생체 외(*in vitro*) 세포 배양이 가능한 것으로 밝혀져 향후 연구에 사용될 전망이다(Jones *et al.*, Science, 346(6210):755-759, 2014). 상기 휴먼 노로바이러스의 배양 방법이 보편화되기 전까지는 휴먼 노로바이러스의 대체 시스템(surrogate system)으로 뮤린 노로바이러스(GV; Murine Norovirus)를 사용하고 있으며, 뮤린 노로바이러스는 대식세포인 RAW 264.7 세포에 배양되기 때문에 비교적 연구가 활발히 진행되어 휴먼 노로바이러스 저감화 연구의 대체 역할을 하고 있다. 상기 RAW 264.7 세포는 STAT1이 결핍된(STAT1^{-/-}) 면역력이 약해진 쥐로부터 얻은 마우스 단핵 백혈구 대식세포주(mouse leukemic monocyte macrophage cell line)로서, 뮤린 노로바이러스-1(MNV-1)이 배양되는 유일한 세포 시스템이다. STAT1은 항바이러스 인터페론 신호전달로 고발현되는 유전자 단백질 중의 하나이다(Wobus *et al.*, PLoS Biol, 2(12):e432, 2004; Wobus *et al.*, J. Virol, 80(11):5104-5112, 2006).

[0005] 노로바이러스는 전 세계적으로 장염을 일으키는 주된 원인으로서, 유아에서 성인까지 나이와 관계없이 다양한 연령층에 감염성 위장염을 일으키며 전염성이 높은 것으로 알려졌다. 따라서 세계 각국에서는 노로바이러스에 의한 식중독의 예방 및 관리를 위해 여러 법규를 개정하여 시행하고 있다. 그러나 노로바이러스에 의한 식중독은 지속해서 발생하고 있어 국제적인 보건문제가 되고 있다. 2012년 우리나라에서 발생한 물 또는 식품을 매개한 유행성 질환은 전년 같은 기간에 대비하여 19.5% 증가하였으며, 특히 11월에서 3월까지 유행성 질환의 발생 빈도가 높은 것으로 나타났다. 원인병원체가 규명된 151건 중 노로바이러스에 의한 질환은 49건(32.5%)을 차지하였고 이는 전년 같은 기간에 대비하여 88.5% 증가한 것이다.

[0006] 식중독으로 인한 사회경제적 비용은 연간 약 1조 3천억 원에 달한다고 보고되었으며, 지속해서 증가하고 있다.

특히, 노로바이러스에 의한 급성 장염이 전체 식중독의 30%를 차지한다고 계산하더라도 노로바이러스에 의한 손실만 약 4천억 원 이상으로 추정된다. 이러한 까닭에 국내에서는 2006년 6월에 노로바이러스에 의한 식중독을 법정 전염병에 포함했으며(실험실 감시대상 전염병), 질병관리본부에서 노로바이러스의 유행 여부를 지속해서 조사 및 감시하고 있다. 아울러 미국 질병관리본부(CDC, Center for Disease Control and Prevention)의 조사에 따르면 미국에서 발생하는 수질 관련 장염 환자의 70% 이상 및 식품 관련 장염 환자의 50% 이상이 노로바이러스에 의한 것으로 보고되었다(Blackburn *et al.*, 2004; Widdowson *et al.*, 2005) 바이러스는 오염된 음식물 또는 물을 섭취하거나, 감염된 환자의 대변 또는 구토물을 통해 다른 사람에게 전염됨으로써 감염되는데 노로바이러스에 대한 인체 면역은 약 14주간만 지속하기 때문에 치료 후 재감염이 가능하므로, 노로바이러스의 감염에는 각별한 주의가 필요하다고 한다.

[0007] 황매목(생강나무; *Lindera obtusiloba* Blume)은 녹나무과 식물에 속하며, 생강나무의 싹이 트기 전에 채취한 어린 가지이다. 황매목은 한국, 일본, 중국 등지에 분포하며 주로 산지의 계곡이나 숲 속의 냇가에서 서식한다. 황매목 나무의 잎과 가지, 열매, 나무껍질 등은 약용 및 식용으로 사용 가능하고, 주요 유효성분으로 게라닐 아세테이트, 린더릭산, tsudzuic acid, L-펠란드린 등을 함유하며 이들 성분이 간 보호와 항당뇨 그리고 항산화 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 황매목 추출물에서 10 mg/mL의 농도에서 생강나무 줄기의 60% 에탄올 추출물의 경우는 메티실린 저항성 스타피로코커스 아우레우스(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)에 대하여, 열수추출물의 경우에는 스타피로코커스 아우레우스(*S. aureus*)에 대해 높은 항균활성을 갖는 것으로 보고되어 있다(Se-Hun Kim *et al.*, 2014)

[0008] 현재 노로바이러스 저감화를 위한 노력은 음식물과 식수의 오염을 가능한 최대한 차단하고, 세척용 지하수 및 조리기구를 포함한 작업장에서의 오염을 저감화하기 위해 물리적 제어법인 열처리, 자외선 처리, 여과 처리 및 화학적 제어법인 오존처리, 염소처리 등을 사용함으로써 이루어지고 있다. 하지만 기존의 물리, 화학적 방법은 식품에 직접 사용했을 때의 안전성 확보의 어려움, 식품 품질 저하 및 영양소 파괴 등의 한계를 가지고 있어, 이를 보완하기 위한 연구가 필요한 실정이다.

[0009] 기존의 노로바이러스 저감화 기술은 화학적, 물리적 제어법이 주로 이용되고 있다. 화학적 소독제는 독성을 가지기 때문에 식품에 직접 적용하기 어렵고, 바이러스의 돌연변이가 발생하여 소독제에 내성을 가질 수 있다. 물리적 제어법 또한 식품 내 영양소를 파괴하거나 관리 또는 유지에 비용이 많이 든다는 단점이 있다. 따라서 본 발명에서는 황매목 추출물의 노로바이러스 저하 효능을 분석하여, 상기 추출물을 포함하는 항-노로바이러스 약물, 식품, 세척제 등의 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

[0010] 이에 본 발명자들은 바이러스 세포배양 연구에 기반을 둔 천연물 바이오 소재 개발을 위하여 예의 노력한 결과, 정상 세포에 대해 독성이 낮고, 저농도로 투여했을 경우에도 노로바이러스의 증식억제 효능이 뛰어난 황매목 추출물의 탁월한 항-노로바이러스 효과를 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 바이러스 제거과정의 효율을 높이기 위한 황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물을 제공하는 것으로, 더욱 상세하게는 독성 및 부작용이 거의 없는 장기간 안정성을 확보하면서, 노로바이러스 감염성 질병의 예방 및/또는 치료용 약제학적 조성물, 건강 기능성 식품, 가축 사료 등에 효과적으로 이용될 수 있는 황매목 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 황매목 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방 및/또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방 및/또는 개선용 건강 기능성

식품을 제공한다.

- [0015] 본 발명은 또한, 황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방 및/또는 개선용 식품 첨가제, 식품 소스 또는 샐러드 드레싱을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방 및/또는 개선용 사료 첨가제를 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스에 의한 식중독 예방용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한, 황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방용 소독제 또는 세척제를 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명의 황매목 추출물은 세포 독성이 낮으면서도, 저농도로 투여했을 경우에도 항바이러스 효과가 탁월하므로, 이를 포함하는 조성물은 노로바이러스 질환의 예방 및 치료에 효과적이고 안전하여 식품 또는 약학 조성물 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 황매목 추출물과 뮤린 노로바이러스를 72시간 동안 4℃에서 반응시킨 후, RAW 264.7 세포에 1시간 동안 처리한 다음, 나타난 플라크 형성 저해 활성을 나타낸 그래프이다. 각각의 발현정도는 평균±SEM으로 나타내었다. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005 vs. 대조군(control))
- 도 2는 상기 도 1의 플라크 형성 저해 활성 결과를 이용하여 바이러스 증식의 50% 억제 농도(IC₅₀)를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 황매목 추출물의 세포독성 실험결과를 나타낸 것이다. 황매목 추출물을 RAW 264.7 세포에 각각 농도별 (5, 20, 40, 50 μg/mL)로 24시간 처리한 후, MTT 용액을 3시간 처리하여 관찰한 세포 생존력(생존 정도)을 그래프로 나타낸 것이다. 각각의 세포 생존력(생존 정도)은 평균±SEM으로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명에서는 황매목 추출물의 노로바이러스 저감화 효과를 평가하기 위해 체외(*in vitro*) 배양이 가능한 뮤린 노로바이러스(Murine Norovirus)를 이용하여 플라크 어세이(Plaque assay)를 실시하였고, 황매목 추출물의 처리 농도에서 잠재적인 독성을 평가하기 위해 세포 생존율 측정법(MTT assay)을 수행하여 향후 약품, 식품 및 조리 기구에서 노로바이러스 활성을 줄일 수 있는 소재를 개발하고자 하였다. 본 발명에서는 휴먼 노로바이러스의 배양 방법 및 동물 모델이 보편화되지 않아 휴먼 노로바이러스의 대체 시스템인 뮤린 노로바이러스를 사용하였고, 뮤린 노로바이러스에 대해 나타나는 항바이러스 효과는 휴먼 노로바이러스에서도 동일하게 적용되는 것을 의미한다(Wobus *et al.*, *PLoS Biol*, 2(12):e432, 2004; Wobus *et al.*, *J. Virol*, 80(11):5104-5112, 2006).
- [0022] 본 발명의 일 실시예에서는 황매목을 건조시킨 후 건조 중량에 대해 10배의 90% 에탄올을 넣고 침지하고, 24시간 동안 실온에서 추출한 다음, 수득한 추출물 여과액을 농축 및 동결 건조하여 황매목 추출물을 준비하였다.
- [0023] 본 발명의 다른 실시예에서는 황매목 추출물을 처리한 뮤린 노로바이러스를 대식세포인 RAW 264.7 세포에 처리한 결과, 플라크의 형성이 황매목 추출물의 농도 의존적으로 감소하였고, 이를 통해 황매목 추출물의 노로바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인할 수 있었다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 황매목 추출물을 뮤린 노로바이러스와 72시간, 4℃에서 반응시킨 후 대식세포인 RAW 264.7 세포에 처리한 결과 바이러스에 의해 형성된 플라크의 수가 대조군 대비 유의적으로 감소함을 확인하였다. 이는 대조군에 비해 황매목 추출물을 처리했을 때 뮤린 노로바이러스의 활성이 저해되는 것을 의미한다. 또한, 황매목 추출물을 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 및 10mg/mL의 농도 범위에서 뮤린 노로바이러스 증식의 50% 억제 농도를 시험한 결과, 황매목 추출물의 IC₅₀가 3.414mg/mL인 것으로 확인되었다. 이는 황매목 추출물

2~4mg/mL의 낮은 추출물 농도에서도 뮤린 노로바이러스 증식 50% 억제 효과를 나타내어 높은 항바이러스 활성을 보임을 확인되었다.

- [0025] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 본 발명은 황매목 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 바이러스는 노로바이러스인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 바이러스는 뮤린 노로바이러스 또는 휴먼 노로바이러스인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 황매목 추출물은 착즙 추출, 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 용매 추출, 또는 환류냉각 추출로 수득하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 용매 추출은 에탄올, 메탄올, 아세톤, 헥산(hexane), 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 물 또는 이들의 혼합물로 추출한 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 추출물은 통상의 천연 추출물의 제조방법에 사용되는 다양한 방법에 따라 추출된 것일 수 있으며, 바람직하게는 용매 추출된 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 황매목 추출물을 0.00001 중량% 내지 100 중량%로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 본 발명은 다른 관점에서, 황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방 및/또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 황매목 추출물을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 황매목 추출물은 천연물질이므로 독성이 전혀 없어서 의약품으로 지속적으로 다량 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 황매목 추출물을 포함하는 조성물은 이미 사용되고 있는 항히스타민제, 소염진통제, 항암제 및 항생제 등의 약제와 함께 제제화하거나 병용하여 사용될 수 있다.
- [0033] 본원에서 사용된 바와 같이, "치료하는"이란 용어는, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "치료"란 용어는 "치료하는"이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다.
- [0034] 용어 "약제학적 조성물(pharmaceutical composition)"은 본 발명의 추출물을 함유하는 화합물과 희석제 또는 담체와 같은 다른 화학 성분들의 혼합물을 의미한다.
- [0035] 용어 "약리학적으로 허용되는(physiologically acceptable)"은 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 담체 또는 희석제로 정의된다.
- [0036] 용어 "담체(carrier)"는 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물로 정의된다. 예를 들어, 디메틸설폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기 화합물들의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.
- [0037] 용어 "희석제(diluent)"는 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다.
- [0038] 여기에 사용된 추출물을 함유하는 화합물들은 인간 환자에게 그 자체로서, 또는 결합 요법에서와 같이 다른 활성 성분들과 함께 또는 적당한 담체나 부형제와 함께 혼합된 약제학적 조성물로서, 투여될 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 사용에 적합한 약제학적 조성물에는, 활성 성분들이 그것의 의도된 목적을 달성하기에 유효한 양으로 함유되어 있는 조성물이 포함된다. 더욱 구체적으로, 치료적 유효량은 치료될 객체의 생존을 연장하거나, 질환의 증상을 방지, 경감 또는 완화시키는데 유효한 화합물의 양을 의미한다. 치료적 유효량의 결정은, 특히, 여기에 제공된 상세한 개시 내용 측면에서, 당업자의 능력 범위 내에 있다.
- [0040] 본 발명의 방법들에서 사용되는 임의의 추출물을 함유하는 화합물에 대한 치료적 유효량은 세포 배양 분석으로부터 초기에 측정될 수 있다. 예를 들어, 선량(dose)은 세포 배양에서 결정된 IC₅₀(half maximal inhibitory concentration) 또는 EC₅₀(half maximal effective concentration)를 포함하는 순환 농도 범위를 얻기 위하여 동물 모델에서 계산될 수 있다. 그러한 정보는 인간에서의 유용한 선량을 더욱 정확히 결정하는데 사용될 수 있

다.

- [0041] 여기에 기재되어 있는 추출물을 함유하는 화합물들의 독성과 치료 효율성은, 예를 들어, LD₅₀(군집의 50%에 대한 치사량), ED₅₀(군집의 50%에 대해 치료 효과를 갖는 선량), IC₅₀(군집의 50%에 대해 치료 억제 효과를 갖는 선량)을 결정하기 위하여, 세포 배양 또는 실험동물에서의 표본 제약 과정들에 의해 산정될 수 있다. 독성과 치료 효과 간의 선량 비가 치료 지수이고 이것은 LD₅₀과 ED₅₀(또는, IC₅₀) 간의 비율로서 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 보이는 화합물들이 바람직하다. 이들 세포 배양 분석에서 얻어진 데이터는 인간에 사용하는 선량의 범위를 산정하는데 사용될 수 있다. 그러한 화합물들의 투여량(dosage)은 바람직하게는 독성이 없거나 거의 없는 상태에서 ED₅₀(또는, IC₅₀)을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다.
- [0042] 황매목 추출물의 투여량은 채용된 투여 형태와 이용된 투여 루트에 따라 상기 범위에서 변화될 수 있다. 정확한 산정, 투여 루트 및 투여량은 환자의 상태를 고려하여 개개의 의사에 의해 선택될 수 있다(예를 들어, Fingl et al., 1975, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p. 1 참조).
- [0043] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 통상적으로, 환자에게 투여되는 조성물의 선량 범위는 환자 체중의 약 0.5 내지 1000 mg/kg 일 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 0.0001 내지 200mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 경구 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 정맥 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 유효성분인 상기 황매목 추출물 외에 다른 성분이 첨가된 혼합물로 제공되는 경우, 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 황매목 추출물을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 99 중량 %, 더욱 바람직하게는 1 중량% 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약제학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0047] 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은, 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는, 화합물의 제형을 의미한다. 용어 "수화물", "용매화물" 및 "이성질체" 역시 상기와 같은 의미를 가진다. 상기 약제학적 염은, 본 발명의 추출물을 함유하는 화합물을, 염산, 브롬산, 황산, 질산, 인산 등의 무기산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산 등의 술폰산, 타타르산, 포름산, 시트르산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산, 카프릭산, 이소부탄산, 말론산, 석신산, 프탈산, 글루콘산, 벤조산, 락트산, 푸마르산, 말레인산, 살리실산 등과 같은 유기 카본산과 반응시켜 얻어질 수 있다. 또한, 본 발명의 추출물을 함유하는 화합물을 염기와 반응시켜, 암모니움 염, 나트륨 또는 칼륨 염 등의 알칼리 금속염, 칼슘 또는 마그네슘 염 등의 알칼리 토금속염 등의 염, 디시클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민, 트리스(히드록시메틸) 메틸아민 등의 유기염기들의 염, 및 아르기닌, 리신 등의 아미노산 염을 형성함으로써 얻어질 수도 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0049] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이

외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순회석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 60, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0050] 본 발명은 또 다른 관점에서, 황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방 및/또는 개선용 건강 기능성 식품, 식품 첨가제, 식품 소스 또는 샐러드 드레싱에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 황매목 추출물을 0.00001 중량% 내지 100 중량%로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0052] 본 발명은 또 다른 관점에서, 황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방 및/또는 개선용 사료 첨가제에 관한 것이다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 상기 황매목 추출물을 0.00001 중량% 내지 100 중량%로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0054] 본 발명은 또 다른 관점에서, 황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스에 의한 식중독 예방용 조성물에 관한 것이다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 황매목 추출물을 0.00001 중량% 내지 100 중량%로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0056] 본 발명은 또 다른 관점에서, 황매목 추출물을 유효성분으로 함유하는 노로바이러스 감염 예방용 소독제 또는 세척제에 관한 것이다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 황매목 추출물을 0.00001 중량% 내지 100 중량%로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 추출물을 함유하는 화합물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염은 다양한 기능성 식품 및 건강 기능성 식품의 제조시 식품의 주성분 또는 첨가제 및 보조제로 사용될 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 '기능성 식품'이란, 일반 식품에 본 발명의 추출물을 첨가함으로써 일반 식품의 기능성을 향상시킨 식품을 의미한다. 기능성은 물성 및 생리기능성으로 대별될 수 있는데, 본 발명의 추출물을 일반식품에 첨가할 경우, 일반 식품의 물성 및 생리기능성이 향상될 것이고, 본 발명은 이러한 향상된 기능의 식품을 포괄적으로 '기능성 식품'이라 정의한다.
- [0060] 본 발명의 황매목 추출물은 바이러스 질환의 예방 및 개선 효과를 위하여 다양한 식품에 첨가될 수 있다. 상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- [0061] 본 발명의 식품은 식품 또는 음료의 형태일 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 유효성분의 양은 일반적으로 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 100 중량%, 바람직하게는 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 음료 조성물의 경우 바람직하게는 0.01~100중량%, 보다 바람직하게는 1~10중량%로 포함될 수 있으며, 구체적으로는 식품 전체의 부피 100ml를 기준으로 0.01g 내지 100g, 바람직하게는 1g 내지 10g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 1~20g, 바람직하게는 약 5~12g이다.
- [0063] 상기 외에 본 발명의 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍

미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 추출물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 추출물 100 중량부 당 0.01~20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0064] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0065] 실시예 1: 황매목 추출물의 제조

[0066] 황매목은 서울 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 상기 황매목을 건조시키고 건조 중량에 대해 10배의 90% 에탄올을 넣고 침지한 다음, 24시간 동안 실온에서 추출하였다. 그다음, 여과지(Whatman filter paper no.2)를 이용하여 여과하여 불용성 물질을 제거하고 추출물 여과액을 수득하였다. 상기 추출물 여과액(이하 추출물)은 감압농축기를 이용하여 40℃ 이하에서 농축한 다음, 동결 건조시켜 80℃에서 보관하였다.

[0067] 실시예 2: 바이러스의 배양

[0068] 실시예 1에서 수득한 황매목 추출물의 항바이러스능을 측정하기 위해 사용된 바이러스는 노로바이러스의 대체 시스템인 뮌린 노로바이러스(MNV-1)이며, 대식세포인 RAW 264.7 세포(KCLB No.40071, 한국세포주은행)에서 증식 배양하였다. RAW 264.7 세포는 10%의 소태아혈청, 1%의 HEPES(2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid), 1% NEAA(Nonessential amino acid), 1.5% 탄산수소나트륨(sodium bicarbonate), 50 µg/mL의 겐타마이신(gentamicin)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[0069] 실시예 3: 바이러스 억제능 분석

[0070] 실시예 1에서 수득한 황매목 추출물의 뮌린 노로바이러스에 대한 바이러스 증식 억제능을 측정하기 위해서, RAW 264.7 세포를 6 웰 플레이트(well plate)에 5×10^6 세포/웰로 분주하고 하루 동안 단층으로 배양하였다. 상기 황매목 추출물을 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 1g/mL로 녹여서 각 농도(0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 또는 10mg/mL)로 희석한 용액과 10^5 PFU/mL의 뮌린 노로바이러스를 72시간 동안 4℃에서 반응시킨 다음, DMEM 배지로 단계 희석을 수행하였다. 6 웰 플레이트에서 세포가 90% 이상 차면 기존 배양액을 제거하고 단계 희석된 뮌린 노로바이러스를 각 웰에 투여하였다. 대조군은 동량의 DMSO로 처리하였다. 뮌린 노로바이러스를 1시간 동안 RAW 264.7 세포에 감염시킨 후 회수하였다. 그다음 2X MEM(Minimal essential media) 배지와 seaplaque agarose를 1:1로 섞은 용액을 3mL씩 분주하고 약 30분 굳힌 다음, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 플라크가 형성될 때까지 2~3일 배양하였다. 플라크가 관찰되면 2X MEM 배지와 seaplaque agarose를 1:1로 섞은 용액에 1% 중성 적색 용액(1% neutral red solution)을 첨가한 후 균일하게 혼합한 다음, 웰 당 3mL씩 분주하였다. 약 30분 간 굳힌 다음, 37℃, 5% CO₂ 배양기에 넣고 1~2일 후 형성된 플라크 수를 측정하여 PFU/mL 단위로 정량 분석하였다. 또한, 상기 희석된 일련의 시험 샘플의 농도를 계산하여 뮌린 노로바이러스 증식의 50% 억제 농도(IC₅₀)를 계산하였다.

[0071] 그 결과, 도 1 및 표 1에 나타난 바와 같이, 황매목 추출물의 농도가 높아짐에 따라 플라크 생성 개수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 대조군에 비해 황매목 추출물을 처리했을 때 뮌린 노로바이러스의 활성이 저해되는 것을 의미한다.

[0072] 또한, 도 2에 나타난 바와 같이, 황매목 추출물을 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10mg/mL의 농도 범위에서 뮌린 노로바이러스 증식의 50% 억제 농도를 시험한 결과, 황매목 추출물의 IC₅₀가 3.414mg/mL인 것으로 확인되었다. 이는 황매목 추출물 2~4mg/mL의 낮은 추출물 농도에서도 뮌린 노로바이러스 증식 50% 억제 효과를 나타내어 높은 항

바이러스 활성을 보임을 확인할 수 있었다.

[0073] 도 1 및 표 1은 뮌 노로바이러스의 플라크 형성 저해 활성을 나타낸 것이다.

표 1

황매목 추출물 농도 (mg/mL)	플라크 형성 (Plaque formation) (%)
대조군	100
0.25	84.33
0.5	89.86
1	77.42
2	89.86
4	52.53
8	8.76
10	5.07

[0074]

[0075] 실시예 4: 독성 평가

[0076] 실시예 1에서 수득한 황매목 추출물이 RAW 264.7 세포에 독성을 미치는지 알아보기 위해 세포 생존율 측정기법인 MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 어세이로 세포 생존율(cell viability)을 측정하였다.

[0077] 물질의 독성은 세포에 처리 후 사멸 정도를 측정하여 확인 가능한데 이는 MTT 용액을 활용하여 간단히 알 수 있다. MTT 용액은 수용성으로 노란색을 띠며 살아있는 세포의 미토콘드리아 내 탈수소효소에 의해 테트라졸륨(tetrazolium)의 링(ring) 구조가 끊어지며 청자색을 띠는 비수용성의 MTT 포르마잔(formazan) 결정으로 환원된다. 즉, 물질에 독성이 있어 세포 사멸 정도가 증가할수록 청자색이 옅게 나타난다.

[0078] 본 발명에서는 상기 실시예 3에서 사용된 바이러스 처리 황매목 추출물 농도 중 4가지인 1, 4, 8 및 10 mg/mL를 선정하여 세포 독성을 측정하였다. 상기 바이러스와 반응시킨 4가지 농도는 RAW 264.7 세포에 처리할 때 DMEM 배지로 1:200으로 희석시켰으며, 결과적으로 세포 처리 농도는 5, 20, 40, 50 ug/mL가 되어 이를 사용하였다. 대조군은 동량의 DMSO로 처리하였다. RAW 264.7 세포를 96 웰 플레이트(well plate)에 2×10^4 세포들로 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 다음, 배지를 흡입하고 DMEM 배지를 이용하여 상기 4가지 농도로 희석한 황매목 추출물을 세포에 처리한 다음, 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 상기 희석한 황매목 추출물을 흡입한 후, MTT 용액(5mg MTT, PBS 1mL 및 DMEM 배지 9mL)을 흡입한 추출물과 동량 처리해 37°C에서 3시간 배양하였다. 상기 MTT 용액을 흡입하고 흡입한 용액과 동량의 DMSO를 분주해 MTT 포르마잔 결정을 녹여 나타낸 청자색을 분광광계도로 수치화하였다.

[0079] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 황매목 추출물을 4가지 농도로 처리하였을 때 모두 대조군 대비 색의 차이를 확인할 수 없었으므로 세포 사멸이 일어나지 않은 것으로 나타났다. 이는 황매목 추출물이 세포에 무해하다는 것을 시사한다.

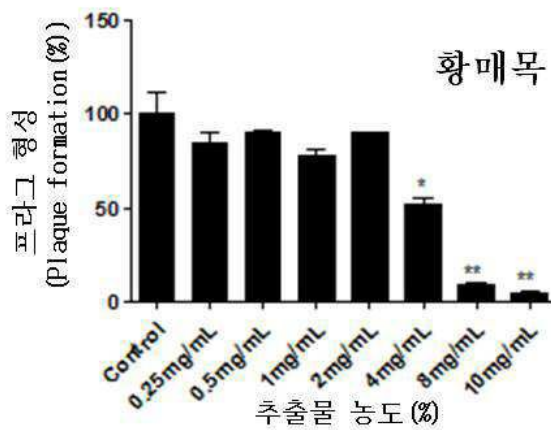
[0080] 통계처리

[0081] 통계분석은 두 그룹 간 유의성 검사로 t-test 검정법을 이용하였고, 대조군과 비교하여 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 인 경우 유의한 차이로 간주하였다. 모든 데이터는 평균(Mean)±측정표준오차(SEM)로 나타내었다.

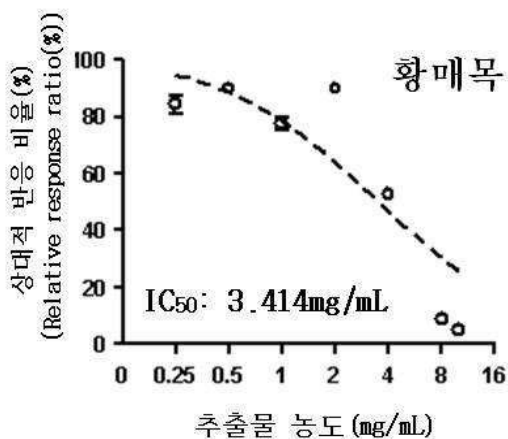
[0082] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

